

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293020

研究課題名(和文) 神経ペプチドPACAPシグナルを標的とした精神疾患の分子機序解明と治療薬開発

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanism of psychiatric disorders that targets PACAP signaling pathways and aimed at the development of therapeutic drug

研究代表者

橋本 均 (Hashimoto, Hitoshi)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30240849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：精神疾患は発症機構が依然不明であり、その解明への期待が高い。近年の研究で、PACAPが精神機能を調節し、精神疾患のリスクに関わる可能性が示唆されている。本研究は、同シグナルを標的とする創薬に向けた知見の集積を目的に、関連する主要な脳内及び細胞内情報伝達経路を解析した。その結果、PACAP欠損に伴う表現型へのNA系の関与、軸索伸長におけるBDNFとの関連、PACAP刺激によるアレスチン2依存的な5-HT_{2A}受容体の細胞内在化、受容体PAC1とアレスチン2の会合と細胞内移行及びERKの活性化等が明らかになった。これらの知見や構築した各種アッセイ系が、今後の創薬研究に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pathophysiological mechanisms for psychiatric disorders remain poorly understood, which need to be urgently addressed. Recent studies have suggested that PACAP is implicated in neuropsychological functions and the risk and pathogenesis of psychiatric disorders. In this study, in order to obtain insights relevant to drug development, we examined brain signaling pathways as well as intracellular signaling pathways that are relevant to PACAP-dependent signaling. We obtained the data showing that the implication of noradrenaline in PACAP-deficient mouse phenotypes, involvement of BDNF signaling in PACAP-dependent axon outgrowth, necessity of -arrestin2 for PACAP-induced 5-HT_{2A} receptor internalization, and interaction and internalization of PACAP receptor PAC1 with -arrestin2, which induces prolonged ERK1/2 activation. The present observations as well as the assay systems generated are expected to contribute to future drug discovery research.

研究分野：神経薬理学

キーワード：PACAP 精神疾患 創薬

1. 研究開始当初の背景

統合失調症やうつ病などの精神疾患は、遺伝的素因と環境的要因が複雑に相互作用して発症するなどの多数の仮説が提案されているが、その分子機構は未だ不明な点が多く、治療薬の有効性が不十分である場合もあるなど、アンメットニーズが最も大きい疾患領域である。しかしながら長年にわたり、新規の治療機構に基づく創薬は成功していない。その最大の理由として、疾患の生物学的な理解が不十分であることが挙げられてきている。従って、今後は精神疾患の分子病態解析を進め、有効な治療標的候補を選定し、創薬を実現することが必要である。

既存の抗精神病薬の治療機序には、ドパミン D2 受容体遮断を介することは周知であるが、近年ドパミン D2 受容体の抗精神病作用が noncanonical な β -アレスチン 2 シグナル経路を介するものであり、G タンパク質(Gi/o)との共役系は錐体外路系の副作用に関わるとして、副作用発現を分離し得る新しい治療標的機構の可能性も示唆されている。

我々は、ヒトでは研究が困難な精神疾患の分子機構について、疾患モデル動物を用いて解析することを目的とし、これまでに、脳に選択的に高発現する PACAP (脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド) の受容体 (1 型 PACAP 受容体 PAC1) をクローニングし、同受容体およびリガンド欠損マウス等を作製し中枢機能を解析してきた。その結果、本ペプチドが精神機能に関わる新しい因子であることを見出し、ヒト遺伝疫学研究によっても、この結果を支持する知見を得ている (Neuron 1993; PNAS 2001; J Clin Invest 2004; J Neurosci 2005; Mol Psychiatry 2007; J Neurochem 2009)。一方最近、海外のグループによる臨床研究により、3 型 PACAP 受容体 (VIPR2) 遺伝子のコピー数変異 (重複・三重複) が、統合失調症の 0.35% の発症原因である可能性 (Vacic et al. Nature, 2011) や、1 型受容体 PAC1 が PTSD の発症・重症度と相関し、血中 PACAP がバイオマーカーになることを示す結果が報告され (Ressler et al. Nature, 2011)、PACAP シグナル系と精神機能・疾患の関連が示されてきている。

2. 研究の目的

以上の研究背景のもとに本研究は、新規の精神疾患治療薬の創製を目指し、PACAP シグナルを標的とした精神疾患の機序解明および創薬に貢献する知見の集積を目的として、PACAP 欠損マウスを用いた行動薬理的検討や、PACAP 下流シグナルの詳細な解析、とくに抗精神病作用との関連が示唆されるが、PAC1 受容体では未だ報告が少ない β -アレスチンシグナル経路の解析や、PACAP の低分子リガンドの作用プロファイリングを行うためのアッセイ系の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

行動薬理的解析のために、雄性 ICR 系または C57BL/6J と 129S6/SvEvTac の交雑背景の PACAP 遺伝子欠損マウスおよび同腹の野生型マウスを用いた。動物の飼育ならびに実験等はすべて、大阪大学動物実験規定を遵守し、大阪大学動物実験委員会の承認を得て倫理的に実施した。

(2) 行動薬理的解析

オープンフィールド試験

オープンフィールド試験は、マウスを新規環境下であるオープンフィールドボックスにいれて、90 分間の移動距離を測定した。

音驚愕反応プレパルス抑制 (PPI) 試験

音驚愕反応は、SR-LAB system を使い、チャンパー内のシリンダーの中にマウスを置いて測定した。65 dB の白色雑音を背景音として 5 分間馴化させた後、5 種類の音刺激による試行 (120 dB のパルスのみを試行、パルスを与える直前に 68、71、74 dB のプレパルスを与える試行、パルスなしの試行) をランダムに合計 100 回行った。得られた驚愕反応強度の値をもとに、PPI を算出した。

新規物体認識試験

マウスをテストケージに移し、2 日間以上個別に飼育した後、トレーニングセッションとして、テストケージ内に同一の物体を 2 つ置き、マウスに 15 分間自由に探索させた。その 6 時間後に、トレーニングセッションで用いた物体 1 つと別の新しい物体 1 つをケージ内に置き、マウスに 5 分間自由に探索させた。マウスが新奇物体を探索した時間から既知物体を探索した時間を引いた差を、2 つの物体に対する探索時間の和で割って D2 値を算出し、マウスの記憶力を評価する指標とした。

(3) 初代培養神経細胞

胎生 16 日齢の ICR マウス胚の海馬より初代培養神経細胞を調製し、播種と同時に PACAP を添加した。培養開始後 3、5、7 日目に固定し、神経細胞マーカーの MAP2 と軸索マーカーの pNF に対する抗体で免疫組織化学的に染色し、樹状突起と軸索の長さを計測した。PACAP 受容体遮断薬の PACAP6-38 や、神経栄養因子 BDNF の TrkB 受容体阻害剤の k252a による神経突起伸展作用への影響も比較解析した。

(4) NanoBiT を用いた PAC1 と β -アレスチンとの相互作用と下流シグナルの解析

HEK293T 細胞や初代培養神経細胞において、NanoBiT タンパク質間相互作用アッセイ法を用いて、結合時の構造的相補性による発光シグナルを指標に、タンパク質間の相互作用とその局在の経時的変化を観察・定量した。また、HaloTag 融合 PAC1 およびセロトニン 2A 受容体 (5-HT_{2A}) を作製し、膜非透過性の HaloTag 蛍光リガンドを用いて細胞膜上の

HaloTag 融合蛋白質を可視化することで、細胞内局在化の解析を行った。さらに、 β -アレスチンの発現抑制による PAC1 や 5-HT_{2A} の局在や下流シグナルに与える影響をウェスタンブロッティング法などにより解析した。

4. 研究成果

(1) Atomoxetine (ATX) による PACAP 欠損マウスの精神行動異常の改善作用

PACAP シグナル系による精神機能調節の解析を目的として、選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 ATX を用いた解析を行った。

ATX は、PACAP 欠損マウスが示す PPI 障害を、野生型マウスと同程度まで改善させた。このとき ATX は、120 dB の音パルスによる驚愕反応の大きさに対しては何ら影響を与えなかった。また ATX は、PACAP 欠損マウスが示す新奇環境における多動と新規物体認識試験における D2 値の低下を有意に改善した。

これまで、PACAP 欠損による表現型とセロトニンシグナルとの関連については種々の知見が得られていたが、本研究の結果は、ノルアドレナリンを含むモノアミン全般の関与を示唆するものである。

(2) 初代培養神経細胞における PACAP の神経突起伸展作用の解析

PACAP による神経突起伸展作用について、マウス初代培養海馬神経細胞を用いて解析した結果、PACAP は BDNF と同様なレベルで、総突起長と突起数を増加させた。また、樹状突起と軸索をそれぞれ免疫組織化学的に染色して計測したところ、PACAP は軸索の伸長を促進し、この作用は PAC1 受容体遮断薬 PACAP6-38 に加え BDNF 受容体阻害剤 k252a によっても阻害されることが分かった。

これらの結果は、細胞内シグナルのレベルにおける PACAP と BDNF の機能的連関を示唆するものである。

(3) PACAP による 5-HT_{2A} 受容体の細胞内局在化とその機構の解析

これまでに、PACAP ヘテロ欠損マウスは幻覚剤である 5-HT_{2A} 受容体作動薬 DOI に過感受性を示すことなどの結果が得られており、PACAP シグナルの機能低下が何らかの機序で、少なくとも見かけ上の 5-HT_{2A} 機能の亢進を伴う精神神経機能の異常を起こす可能性が想定されて来ている。また最近、PACAP 刺激が 5-HT_{2A} の細胞内在化を起こすことも分かっている。そこで本研究では、この細胞内在化の分子機構について、とくに β -アレスチンの関与について検討を加えた。

PACAP 刺激時の HaloTag 融合 5-HT_{2A} の細胞内在化は、siRNA による β -アレスチン 2 の発現抑制によって有意に抑制された。

(4) β -アレスチンを介する PACAP シグナ

ル伝達とその動態の解析

創薬標的候補としての PAC1 受容体シグナルにおける β -アレスチン経路を解析するために、 β -アレスチンと PAC1 受容体との相互作用を NanoBiT の構造的相補性による化学発光シグナルで検出するアッセイ系を構築した。PAC1 と β -アレスチン 1 または β -アレスチン 2 との相互作用は、PACAP 刺激後にその濃度依存的に増加した。これらの結合は、共免疫沈降法によっても確認された。これらの結果より、PAC1 は β -アレスチン 1 および 2 の両方と相互作用することが明らかになった。またこれらの相互作用に PKA と PKC が関与しないことが、両キナーゼの阻害剤を用いた解析から明らかになった。

次に発光顕微鏡を用いて、ライブイメージングを行った結果、PACAP 刺激後、PAC1 と β -アレスチン 1 の複合体は細胞膜付近にとどまるが、 β -アレスチン 2 との複合体は、細胞膜から細胞質へ移動することが明らかになった。

HaloTag 融合 PAC1 を用いて PACAP 刺激後の細胞内動態を調べたところ、siRNA による β -アレスチン 2 の発現抑制によって、PAC1 の細胞内への移動が抑制された。またこのとき、ERK1/2 のリン酸化レベルも減少した。これに対して、 β -アレスチン 1 の発現抑制は、ERK1/2 のリン酸化をむしろ増加させた。

本研究の結果は、PACAP シグナルを標的とする中枢疾患の創薬において、G タンパク質および β -アレスチンに媒介される細胞内シグナルのバイアスによって有効性の最大化や有害作用の抑制を目指す今後の研究に有用な知見となるものと考えられる。また、本研究で構築した NanoBiT タンパク質間相互作用の解析系等は、 β -アレスチンシグナル選択的アゴニストなどの評価系としての応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 38 件)

1. β -Arrestin1 and 2 differentially regulate PACAP-induced PAC1 receptor signaling and trafficking

Shintani Y, Hayata-Takano A, Moriguchi K, Nakazawa T, Ago Y, Kasai A, Seiriki K, Shintani N, Hashimoto H.

PLoS One 13(5): e0196946, 2018

doi: 10.1371/journal.pone.0196946

2. Impaired extinction of cued fear memory and abnormal dendritic morphology in the prelimbic and infralimbic cortices in VPAC2 receptor (VIPR2)-deficient mice

Ago Y, Hayata-Takano A, Kawanai T, Yamauchi R, Takeuchi S, Cushman JD, Rajbhandari AK, Fanselow MS, Hashimoto H, Waschek JA.

Neurobiol. Learn Mem. 145:222-231, 2017

doi: 10.1016/j.nlm.2017.10.010

3. High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents and primates

Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue K, Uezono S, Takada M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Waschek JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H. *Neuron* 94: 1085-1100, 2017
doi: 10.1016/j.neuron.2017.05.017

4. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background

Farkas J, Kovacs LA, Gaspar L, Nafz A, Gaszner T, Ujvari B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglodi D, Gaszner B. *Neuroscience* 354: 11-29, 2017
doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.019

5. Prostaglandin D2 signaling mediated by the CRTH2 receptor is involved in MK-801-induced cognitive dysfunction

Onaka Y, Shintani N, Nakazawa T, Kanoh T, Ago Y, Matsuda T, Hashimoto R, Ohi K, Hirai H, Nagata KY, Nakamura M, Kasai A, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Takuma K, Ogawa A, Baba A, Hashimoto H. *Behav. Brain Res.*, 314: 77-86, 2016
doi: 10.1016/j.bbr.2016.07.050

6. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brain stem centers

Kormos V, Gaspar L, Kovacs LA, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z, Gaszner B. *Neuroscience* 330: 335-358, 2016
doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.004

7. Atomoxetine reverses locomotor hyperactivity, impaired novel object recognition, and prepulse inhibition impairment in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

Shibasaki Y, Hayata-Takano A, Hazama K, Nakazawa T, Shintani N, Kasai A, Nagayasu K, Hashimoto R, Tanida M, Katayama T, Matsuzaki S, Yamada K, Taniike M, Onaka Y, Ago Y, Waschek JA, Köves K, Reglodi D, Tamas A, Matsuda T, Baba A, Hashimoto H. *Neuroscience* 297: 95-104, 2015
doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.062.

8. PACAP enhances axon outgrowth in cultured hippocampal neurons to a comparable extent as BDNF

Ogata K, Shintani N, Hayata-Takano A, Kamo T, Higashi S, Seiriki K, Momosaki H, Vaudry D, Vaudry H, Galas L, Kasai A, Nagayasu K, Nakazawa T, Hashimoto R, Ago Y, Matsuda T, Baba A, Hashimoto H.

PLoS One 10: e0120526, 2015

doi: 10.1371/journal.pone.0120526

9. CRTH2, a prostaglandin D2 receptor, mediates depression-related behavior in mice

Onaka Y, Shintani N, Nakazawa T, Haba R, Ago Y, Wang H, Kanoh T, Hayata-Takano A, Hirai H, Nagata KY, Nakamura M, Hashimoto R, Matsuda T, Waschek JA, Kasai A, Nagayasu K, Baba A, Hashimoto H.

Behav. Brain Res. 284: 131-137, 2015

doi: 10.1016/j.bbr.2015.02.013

10. Simultaneous neuron- and astrocyte-specific fluorescent marking.

Schulze W, Hayata-Takano A, Kamo T, Nakazawa T, Nagayasu K, Kasai A, Seiriki K, Shintani N, Ago Y, Farfan C, Hashimoto R, Baba A, Hashimoto H.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 459: 81-86, 2015

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.073

〔学会発表〕(計 71 件)

国際学会(計 17 件)

1. Yukio Ago

Modeling VIPR2 linkages to schizophrenia in mice

The 13th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides (2018)

2. Hitoshi Hashimoto

Activation of the VPAC2 receptor inhibits neurite outgrowth and branching of cortical neurons by a PKA-dependent mechanism

Neuroscience 2016 (2016)

3. Hitoshi Hashimoto

Whole Brain Imaging to Investigate Physiology and Pathophysiology of Brain Disorders

VIMM Seminar (日伊国交 150 周年事業)(招待講演) (2016)

4. Yukio Ago

Overactivation of the VPAC2 receptor during the early postnatal period causes prefrontal synaptic abnormalities and cognitive dysfunction in mice
30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (2016)

5. Hitoshi Hashimoto

Roles of PACAP in Depressopm-Like Behavior
12th International Symposium on VIP/PACAP and Related Peptides (2015)

6. Yukio Ago
Overactivation of the VPAC2 receptor during postnatal brain development causes prefrontal synaptic abnormalities and cognitive dysfunction in mice
12th International Symposium on VIP/PACAP and Related Peptides (2015)
7. Atsuko Hayata
PACAP-PAC1 signaling pathway regulates internalization of serotonin 2A receptor in a PKC and barrestin2 dependent manner
29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (2014)
8. Keita Moriguchi
A crosstalk between PACAP and serotonin 2A signaling
20th International Symposium on Regulatory Peptides (REGPEG2014) (2014)
- 国内学会（うち招待講演 5 件）
9. 橋本 均
精神疾患の病態解析と創薬へ向けたモデル研究
第 61 回薬学会関東支部大会 (2018)
10. 新谷 勇介
β-アレスチンを介する PACAP-PAC1 シグナルの解析
第 131 回 日本薬理学会 近畿部会 (2017)
11. 吾郷 由希夫
VPAC2 受容体を介する大脳皮質神経発達異常と精神疾患との関連
第 90 回薬理学会年会 (2017)
12. 橋本 均
CNS 創薬を支援する疾患モデルの開発
日本安全性薬理研究会第 8 回学術年会 (2017)
13. 早田 敦子
神経細胞の成熟における PACAP と BDNF の役割
第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会合同年会 (2016)
14. 橋本 均
精神疾患の分子機構の解析と創薬に向けた疾患モデル研究
第 61 回脳の医学・生物学研究会（招待講演）(2016)
15. 吾郷 由希夫
統合失調症における VIP/PACAP 受容体 VPAC2 活性化の病態的意義
第 13 回 GPCR 研究会 (2016)
16. 橋本 均
神経ペプチド PACAP による精神機能調節：

創薬への展望
第 36 回日本生物学的精神医学会 第 57 回日本神経化学学会大会 合同年会 (2014)

17. 橋本 均
アメリカにおける神経精神薬理学会の動向
第 24 回 日本臨床精神神経薬理学会 第 44 回日本神経精神薬理学会 合同年会 双方向性トランスレーショナル研究の実現（招待講演）(2014)

〔その他〕
ホームページ等
大阪大学・大学院薬学研究科・神経薬理学分野
<http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
橋本 均 (HASHIMOTO, Hitoshi)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：30240849
- (2) 研究分担者
早田 敦子 (HAYATA, Atsuko)
大阪大学・大学院連合小児発達学研究科・助教
研究者番号：70390812
- (3) 連携研究者
橋本 亮太 (HASHIMOTO, Ryota)
大阪大学・大学院連合小児発達学研究科・准教授
研究者番号：10370983